Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der
Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. Ernst Schütte

Über die Freisetzung eines Glykomakropeptides bei der Einwirkung von Pepsin auf Casein bei pH 6,8

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Werner Habermann
aus
Döllensradung, Kreis Landsberg/Warthe

1966

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der
Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. Ernst Schütte

Über die Freisetzung eines Glykomakropeptides bei der Einwirkung von Pepsin auf Casein bei pH 6,8

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Werner Habermann
aus
Döllensradung, Kreis Landsberg/Warthe

Dekan:	Professor Dr. med. Wilhelm M a ß h o f f
Referent:	Professor Dr. med., Dr. rer. nat. Ernst S c h ü t t e
Korreferent:	Priv. Doz. Dr. rer. nat. Peter S i e g m u n d

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 12. 1. 1966

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

THEORETISCHER TEIL

1. Einleitung 5
2. Problemstellung 10
3. Arbeitsgang und Methoden 11
4. Ergebnisse 13
5. Diskussion 16
6. Zusammenfassung 18

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Caseinherstellung 19
2. Aufnahme der NPN-Zeitkurven mit Lab und Pepsin und Darstellung der Lab- und Pepsinpeptide 19
3. Stickstoffbestimmung mit Nesslers-Reagenz und nach Kjeldahl 22
4. Phosphatbestimmung 24
5. Qualitative und quantitative Zuckerbestimmungen 25
   a. Galaktose 25
   b. Neuraminsäure 27
   c. Galaktosamin 29
6. Qualitative Aminosäurenanalyse 32
7. Versuche zur quantitativen Aminosäuren-Papierchromatographie 34
8. Quantitative Aminosäurenanalyse 35

LITERATURVERZEICHNIS 36

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546527_0062

EINLEITUNG

HAMMARSTEN (23) arbeitete als erster über die proteolytische Wirkung des Labfermentes und stellte fest, daß Casein in Gegenwart von Calciumionen durch das Lab in das unlösliche Paracasein und die löslichen "Molkenalbumose" überführt wurde.

Erst 50 Jahre später (1925) wurde von LINDERSTRØM - LANG und KODAMA (33) auf diesem Gebiet wieder eine wichtige Arbeit veröffentlicht, als sie die Ergebnisse ihrer Forschungen über die Löslichkeit des Caseins bekanntgaben und dabei auch die Vermutung äußerten, daß es sich bei dem Casein nicht um ein einheitliches Protein handelte.

PEDERSEN (44) und MELLANDER (37) bestätigten diese Vermutung. PEDERSEN fand 1936 bei Arbeiten mit der Ultrazentrifuge mehrere Fraktionen im Casein und MELLANDER isolierte 1939 elektrophoretisch das alpha-, beta- und gamma-Casein.

Trotzdem konnte noch 1939 C. OPPENHEIMER in seinem Buch "Die Fermente und ihre Wirkung" die Labgerinnung der Milch als eines der dunkelsten Kapitel bezeichnen. Reines Labferment stand seinerzeit noch nicht zur Verfügung und die heterogene Zusammensetzung des Substrats gab weitere Rätsel auf.

1945 stellte dann BERRIDGE (8) das erste kristallisierte Lab her, das sich chromatographisch auch noch in drei verschiedene Molekülarten trennen ließ, die sich in ihrer Aktivität etwas unterschieden (40).

Mit der Verbesserung der analytischen Methoden wurde schließlich festgestellt, daß auch die drei Hauptgruppen alpha, beta und gamma in sich nicht einheitlich sind. Es steht auch heute noch nicht genau fest, wieviele echte Fraktionen das Casein hat, da die Fraktionierung durch stark wirksame Assoziationskräfte erschwert wird und durch zu forciertes Fraktionieren nicht reproduzierbare Kunstprodukte entstehen können.

Eine bedeutsame Fraktion wurde 1956 von WAUGH und v. HIPPEL (50) aus dem alpha-Casein isoliert und zwar das kappa-Casein. Zum besseren Verständnis der Gerinnungsvorgänge ist eine kurze Darstellung der physikalisch Eigenschaften des Caseins angebracht (34). Casein bildet 78 % des Gesamtproteins der Milch und liegt in Form eines Calciumphosphorcaseinatkomplex vor. In der Milch werden die verschiedenen Arten der Caseinmoleküle durch primäre und sekundäre Bindungen als Micellen zusammengehalten. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen stellte NITSCHMANN (39) 1949 fest, daß diese Micellen einen durchschnittlichen Durchmesser von 80 - 100 höchstens jedoch einen von 280 mμ haben. BOHREN und WENNER (11) konten zeigen, daß die Zusammensetzung dieser Micellen nicht konstant sonder von der Temperatur und dem Calciumgehalt abhängig ist.

Über die Art der primären Bindungen in den Micellen existieren viele Vermtungen. Phosphoserin und die Dicarbonaminosäuren haben aber die größte Bedeutung. KIRCHMEIER (27) hat außerdem noch darauf hingewiesen, daß durch die Labaktion Milch- und Zitronensäure freigesetzt werden, die fest mit dem Casein verbunden sind. Er glaubt, daß diese gebundenen Säuren ebfalls zur Stabilisierung der Caseinmicellen beitragen.

Eine entscheidende Entdeckung bei der Erforschung der Gerinnung der Milc durch Lab gelang 1953 ALAIS, MOCQUOT, NITSCHMANN und ZAHLER (2 Sie stellten fest, daß man während des Gerinnungsprozesses 2 Stadien klar unterscheiden müsse: ein enzymatisches Stadium während dessen das Lab einen Teil des Caseins auflöst und ein eigentliches Koagulationsstadium, in welchem die Ca-caseinatmicellen aggregieren.

Unabhängig vom eigentlichen Gerinnungsvorgang läuft noch ein proteolytisch Stadium ab.

Das enzymatische Stadium wurde als Primärreaktion, das Koagulationsstadium als Sekundärreaktion und das proteolytische als Tertiärreaktion bezeichnet.
Während der Primärreaktion wird durch Lab eine kleine Menge Nichtprotei stickstoff (NPN) in Freiheit gesetzt, der in Trichloressigsäure (TCE) lösl

ist und bestimmt werden kann. Dadurch kann der zeitliche Ablauf der Primärreaktion chemisch verfolgt werden.

Die Abspaltung von NPN ist zu Beginn der Reaktion am größten und nimmt nach der sichtbaren Gerinnung der Milch nicht mehr zu. Die absolute Menge des freigesetzten NPN variiert mit den einzelnen Caseinbereitungen. Der Anteil des in TCE löslichen NPN hängt von der TCE-Konzentration ab. Bei einer 12%igen TCE beträgt sie im Durchschnitt 2 % des Caseinatstickstoffs.

Die Art des NPN wurde von NITSCHMANN und HENZI (41) untersucht. Es handelt sich um ca. 9 Peptide, die chromatographisch voneinander getrennt wurden.

Schon vorher hatte ALAIS (3) auf ein besonderes Peptid hingewiesen, daß im Chromatogramm bei den gewählten Lösungsmitteln am Startpunkt liegen bleibt und nicht durch Cellulosemembranen diffundiert. Es handelt sich um ein Glykomakropeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 6000, das einen Zuckeranteil von rund 40 % besitzt. Als Zucker wurden von NITSCHMANN und HENZI (41) N-Acetylneuraminsäure, Galaktose und Glucosamin nachgewiesen. Es wird jetzt fast einheitlich in der Literatur als Caseinglykopeptid bezeichnet.

WAKE (48) wies nach, daß die kappa-Fraktion des Caseins primär mit dem Lab reagiert. Bei der Labung der einzelnen Caseinfraktionen entsteht nämlich nur beim Gesamt-, alpha- (aus dem sich das kappa-Casein gewinnen läßt) und kappa-Casein das von ALAIS entdeckte Glykomakropeptid. Die Ausbeute ist bei der Labung des kappa-Caseins ungefähr vier - fünfmal höher als beim Gesamtcasein (49).

Auch durch die Arbeiten von GARNIER und BRIGNON (21) stellte sich heraus, daß das kappa-Casein gegenüber Lab wesentlich empfindlicher ist als das Gesamtcasein. Diese Empfindlichkeit ist durch das Auftreten einer neuen titrierbaren Gruppe mit einem pK zwischen 4 und 5 gekennzeichnet. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß die vom Lab hydrolysierte Bindung wahrscheinlich eine Esterbindung ist. Den Beweis für diese Ansicht erbrachten mit rein chemischen Mitteln JOLLÈS, ALAIS und JOLLÈS (26), als sie $LiBH_4$ auf das Casein einwirken ließen und die entstehenden Produkte untersuchten.

Zwischen der Menge der in Freiheit gesetzten Caseinglykopeptide und der Empfindlichkeit des Gesamtcaseins gegen Calciumionen einerseits und der Zahl der im kappa-Casein hydrolysierten Esterbindungen andererseits besteht eine lineare Beziehung. So steht die esterspaltende Wirkung des Labs auf das kappa-Casein in direkter Beziehung zur koagulierenden Wirksamkeit des Enzyms, das hierbei als Esterase angesehen werden muß (19).

Wenn man die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen berücksichtigt, kommt man zu folgender Vorstellung über die Vorgänge bei der Gerinnung der Milch:

Das gerinnungsfähige Protein der Milch ist das Casein, das eine heterogene Substanz ist. 15 % des Caseins werden vom kappa-Casein gebildet (nach ALAIS (5)), das sich zwar immunbiologisch einheitlich verhält, trotzdem aber nach neueren Untersuchungen von BEEBY und NITSCHMANN (7) und LAHAV und BABAD (29) noch in weitere Unterfraktionen zerlegt werden kann. Ein Teil dieses kappa-Caseinkomplexes ist das eigentliche Substrat des Labfermentes.

In einem ersten Schritt wird während der enzymatischen Primärreaktion eine Esterbindung gespalten und dadurch neben einigen anderen Peptiden das extrem hydrophile Glykomakropeptid, das von ALAIS entdeckt wurde, freigesetzt. Dieses hat ein MG von etwas über 6 000.

Das kappa-Casein wirkt als Schutzkolloid und stabilisiert die mizellare Ca-Caseinatsuspension der Milch. Es verliert diese Eigenschaft, wenn das Glykopeptid abgespalten wird. Durch die Abspaltung nimmt die Empfindlichkeit des Caseins gegen Calciumionen zu und es aggregieren daraufhin während der Sekundärreaktion die Caseinmizellen. Es kommt zur Koagulation. In den neuesten Arbeiten von LAHAV und BABAD (29, 30) wird die Auffassung vertreten, das sich im uneinheitlichen kappa-Caseinkomplex verschiedene Schutzkolloide befinden und zwar für jede Caseinfraktion spezifische, die das Casein gegen die Ausfällung durch Calcium schützen. Es gelang, diese als K-alpha, K-beta und K-gamma bezeichneten Schutzkomponenten durch eine Spezialbehandlung mit Lab loszulösen und als einheitliche Körper zu isolieren und zu analysieren. Als Beweis dieser Anschauung konnte aus den

fraktionierten Komponenten - den calciumempfindlichen Fraktionen und ihren Schutzkomponenten - der lösliche Gesamtcaseinkomplex wiederhergestellt und erneut mit Lab zerlegt werden.

Dieser Ansicht von den spezifischen Schutzkolloiden wurde zunächst von LINDQVIST (29) mit dem Argument widersprochen, daß es sich bei diesen K-substanzen möglicherweise auch um spätere Proteolyseprodukte handeln könne, die häufig eine unspezifische Schutzwirkung ausüben können. Nach den erfolgreichen Resyntheseversuchen glauben aber LAHAV und BABAD (30), daß ihre Ansicht richtig sei. Nach der enzymatischen Primärreaktion und der sekundären Koagulationsphase setzt das Lab in der Tertiärphase eine langsame proteolytische Wirksamkeit fort, die zwar für die Dicklegung der Milch keine Bedeutung hat, aber für die Reifung des Käses wichtig ist. Bei der normalen Einlabungstemperatur von 30° C erfolgt die Dicklegung der Milch gegen Ende der ersten Phase dieser Proteolyse. Daß Labung und Proteolyse aber zwei verschiedene Vorgänge sind,haben GARNIER und CHEVALIER (20) dadurch bewiesen, daß sie die Einlabungstemperatur herabgesetzt haben. Dann fallen Dicklegung und Proteolyse nicht mehr zusammen, sondern die Koagulation bleibt hinter der Proteolyse beträchtlich zurück. Ist z.B. bei 0° C bei der gewählten Labmenge die Proteolyse in 3 Stunden beendet, so erfolgt die Koagulation erst nach etwa 110 Stunden !

Das zweifellos interessanteste Produkt, das bei der Labung der Milch oder von Caseinlösungen entsteht, ist das beschriebene Glykomakropeptid. Es wurde in der Zwischenzeit von mehreren Forschern eingehend untersucht (6,12, 24, 42) ohne daß es möglich war, seine Struktur völlig aufzuklären.

Das Glykomakropeptid besteht aus einem Peptidanteil von rund 60 % und einem Zuckeranteil von rund 40 %. Von den Kohlenhydraten stellt die N-Acetylneuraminsäure den größten Teil. Sie besteht aus Brenztraubensäure und N-Acetylmannosamin (15). Doch schwanken die veröffentlichten Werte auch bei denselben Forschern beträchtlich. Es dürfte z.T. daran liegen, daß sie gegenüber Säure äußerst empfindlich ist und sich unter Huminbildung zersetzt. Außerdem enthält das Peptid noch Galaktosamin und Galaktose. Eine N-endständige Aminosäure konnte nicht nachgewiesen werden, vielmehr

scheint die Neuraminsäure endständig zu sein, da sie zu 66 % durch die Neuraminidase aus Vibrio cholerae von dem Glykomakropeptid des kappa-Caseins abgespalten wird (47).

Glykomakropeptide mit sehr ähnlicher Zusammensetzung wurden von ALAIS und JOLLÈS (4) bei der Labung von Frauenmilch und von JOLLÈS, ALAIS und JOLLÈS (25) bei der Labung von Casein aus Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch isoliert. Diese Übereinstimmung gilt als weiterer Beweis, daß die Primärreaktion der Labung die Abspaltung eines Glykomakropeptids aus dem Casein ist.

PROBLEMSTELLUNG

Bekanntlich bringen auch eine Reihe anderer proteolytischer Enzyme Milch und Calciumcaseinatlösungen zur Gerinnung. MATTENHEIMER und NITSCHMANN (36) untersuchten die NPN-Abspaltung bei der Einwirkung der gerinnungsaktiven Enzyme Pepsin, Chymotrypsin, Papain und einer Pilzprotease und des nicht gerinnungsaktiven Trypsins. Der vom Lab her bekannte Reaktionsablauf mit einer bis zum Eintritt der Gerinnung raschen Zunahme des NPN wurde mit allen gerinnungsaktiven Proteasen gefunden. Mit Chymotrypsin, Papain und der Pilzprotease war die Primärreaktion vom proteolytische Abbau des Caseins überlagert. Die mit Pepsin erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeitskurven (NPN aufgetragen über der Zeit) waren aber identisch mit den mit Lab aufgenommenen Kurven. In der vorliegenden Arbeit wird durch Pepsin freigesetztes NPN isoliert und analysiert und mit dem durch Lab abgespaltenen NPN verglichen. Ist die Abspaltung eines Glykomakropeptids aus dem Casein spezifisch für die Primärreaktion der Milchgerinnung, dann sollte das durch Lab abgespaltene Glykomakropeptid mit dem durch Pepsin abgespaltenen identisch, oder diesem wenigstens sehr ähnlich sein.

ARBEITSGANG und METHODEN

1) Caseinherstellung

Zur Herstellung unseres Ausgangsmaterials, des Caseins, wurde frische entfettete Milch durch Zugabe von HCl ausgefällt, mit aq. dest. gewaschen, das restliche Fett mit Äther extrahiert und das Casein an der Luft getrocknet.

2) Na-Caseinatlösungen

Für fast alle unsere Versuche wurden Na-caseinatlösungen verwendet. Dazu wurde das trockene Casein durch Zusatz von 0,1 n NaOH und Wasser gelöst.

3) Bestimmung von Nicht-proteinstickstoff (NPN)

Zunächst wurde die Abspaltung des NPN zeitlich verfolgt. Nach Zugabe der Fermente zu Caseinlösungen wurden diese Gemische nach verschiedenen Zeiten mit TCE (Endkonzentration 12 %) versetzt und in den Filtraten der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Die Menge dieses N, ausgedrückt in Prozent des Gesamt-N, wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die dabei erhaltenen Kurven sind auf Seite 21 Abb. 1 dargestellt.

4) Präparation der Peptide

Da die gesuchten Caseinglykopeptide während der Primärreaktion durch die Fermente vom Casein freigesetzt werden, wurden die Caseinlösungen mit Lab und Pepsin versetzt und nach einer genügend langen Inkubationszeit mit TCE gefällt. Da das Peptid nicht durch Cellophanmembranen diffundiert, kann es aus dem Filtrat durch Dialyse von Begleit-Substanzen (u.a. niedere Peptide) gewonnen werden. Das große Volumen wurde durch eine von uns erdachte einfache Anordnung (s. Abb. 3 , S. 22) in den Dialysierschläuchen durch einen Föhn auf insgesamt 1/8 - 1/10 eingeengt. Nach chromatographischen und elektrophoretischen Reinheitsprüfungen wurden die Peptide durch Gefriertrocknung in fester Form gewonnen.

5) Stickstoffbestimmung

Für die Stickstoffbestimmung der Peptide wurde zuerst die von BOHREN (10) angegebene Mikromethode mit Nesslers-Reagenz erprobt, deren Feh-

lergrenze trotz aller Verbesserungen weit über ± 5 % lag. Deshalb wurde auf die bewährte Methode nach Kjeldahl zurückgegriffen.

6) Phosphatbestimmung

Der Phosphatbestimmung lag die von K. LOHMANN und L. JENDRASSIK (35) modifizierte Methode von FISKE - SUBBAROW (18) zu Grunde, die wir für unsere Zwecke weiter veränderten, da es durch die Veraschung mit konz. Schwefelsäure zu einer störenden pH-Verschiebung und durch die Neutralisation mit konz. NH_3 zu einer Erhöhung der Ionenkonzentration kam.

7) Galaktosebestimmung

Galaktose wurde nach Hydrolyse der Peptide papierchromatographisch nachgewiesen und quantitativ mit dem Anthronreagenz bestimmt (16).

8) Neuraminsäurebestimmung

Neuraminsäure wurde qualitativ nach Hydrolyse mit methanolischer HCl durch die direkte Reaktion nach MORGAN - ELSON (38) und quantitativ nach der Analysenvorschrift von BÖHM (9) bestimmt. Da uns reine Neuraminsäure zur Verfügung stand, konnten wir eine Eichkurve unter denselben Bedingungen anfertigen.

9) Hexosaminbestimmung

Wie vor uns auch NITSCHMANN und HENZI (41) glaubten wir zunächst, daß es sich bei dem vorliegenden Aminozucker um Glucosamin handele. Wir bestimmten ihn zuerst als solchen nach der von WINZER (51) angegebenen Methode quantitativ. Bei einer Nachuntersuchung wurde das Hexosamin aber als Galaktosamin identifiziert und als solches bestimmt (22).

10) Qualitative Bestimmung der Aminosäuren

Die Aminosäuren wurden nach salzsaurer Hydrolyse der Peptide durch zweidimensionale Papierchromatographie nach der Methode von A. L. LEV (31) identifiziert.

11) Quantitative Bestimmung der Aminosäuren

Die quantitative papierchromatographische Aminosäureanalyse nach Überführung der Aminosäuren in ihre Dinitroverbindungen, wie sie von F. SANGER (45), HEIN und MOORE (46) und A. L. LEVY (32) angegeben worden ist, gelang nicht in befriedigender Weise, da wahrscheinlich die KH-Kom-

ponenten stören. Deshalb wurde sie von Herrn Professor MATTENHEIMER mit der automatisch registrierenden Apparatur von STEIN und MOORE in Chicago durchgeführt (22).

ERGEBNISSE

In parallel laufenden Versuchen wurden Na-Caseinatlösungen mit Lab bzw. Pepsin versetzt. Enzymatisch freigesetzter NPN wurde in TCE-Filtraten (Endkonzentration 12% TCE) als Funktion der Zeit bestimmt. Die Kurven mit Lab und mit Pepsin sind fast identisch (Abb. 1). Nach Eintritt der Gerinnung nimmt der NPN nicht mehr nennenswert zu.

Die TCE Filtrate wurden nach der Vorschrift von NITSCHMANN und HENZI (41) zur Darstellung der Glykomakropeptide aufgearbeitet.
Wie durch Lab so wird auch durch Pepsin ein Glykomakropeptid aus dem Casein freigesetzt, das man nach genügend langer Dialyse bis auf Spuren rein darstellen kann. Im Chromatogramm bleibt es bei den gewählten Lösungsmitteln am Startpunkt liegen (Abb. 2 , S. 21), während noch vorhandene niedermolekulare Peptide wandern.

Elektrophoretisch waren keine Unterschiede zwischen den beiden Peptiden festzustellen. Sie wandern bei einem pH von 7,8 beide zur Anode (Abb. 4 , S. 22).

Die Ausbeute war bei dem Pepsinpeptid um ca. 50% niedriger als bei dem Labpeptid und betrug bei diesem 6,6 mg/1 g Casein.
Der Phosphatgehalt ist für beide Peptide fast gleich (s. S. 15 , Tab. 1). Er beträgt 0,7 - 0,8 %.

Nach salzsaurer Hydrolyse wurden die Aminosäuren papierchromatographisch bestimmt. Eine eindimensionale Chromatographie erwies sich für unseren Fall als unzureichend, (s. Abb. 13 , S. 32). Deshalb wurde die zweidimensionale Methode nach A. L. LEVY (31) durchgeführt. Beide Chromatogramme zeigten die gleiche Anzahl von Aminosäuren (s. Abb. 14 , S. 33 und Abb. 15 , S. 33), die durch vorhergehende vergleichende Chromatographie

von Aminosäurengemischen identifiziert werden konnten. (S. Tab. 1 , S.15). Es fanden sich Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Threonin, Prolin, Valin, Leucin, Isoleucin, Alanin und Lysin.

Wir versuchten zunächst, die Aminosäuren in Hydrolysaten der Peptidpräparate quantitativ nach ABDERHALDEN (1) und SANGER (45) zu bestimmen. Die Aminosäuren werden in die DNP-Derivate überführt und nach zweidimensionaler Papierchromatographie (32) eluiert und colorimetrisch bestimmt. Ausgehend von synthetischen Aminosäurengemischen waren die Ergebnisse zufriedenstellend, jedoch erreichten wir nur unvollkommene Trennung der DNP-Aminosäuren auf dem Papier mit den Peptidhydrolysaten. Wir vermuten, daß der Kohlenhydratanteil der Peptide störend wirkte. Wir haben daher die quantitative Aminosäurenanalyse unserer Peptide mit der automatisch registrierenden Apparatur nach SPACKMAN, STEIN und MOORE (46) durchgeführt (22). Neben den von uns mit Lab und mit Pepsin hergestellten Peptiden untersuchten wir ein von NITSCHMANN und HENZI (41) mit Lab gewonnenes Peptid und nahmen in Tabelle 1 die Analysenwerte derselben Autoren mit auf, wie sie sie für ihr Präparat GMP (b) 1 angegeben haben (41).

Nach Hydrolyse der über P_2O_5 getrockneten Peptide wurden auch die Zucker papierchromatographisch bestimmt. Die Hydrolysate wurden nebeneinander aufgetragen und Vergleichssubstanzen mitlaufen gelassen. Auf diese Weise konnte Galaktose eindeutig identifiziert werden.

Außerdem wurden noch an Kohlenhydratbestandteilen N-Acetylneuraminsäure und ein Aminozucker gefunden, den wir zunächst als Glucosamin ansahen und als solchen quantitativ bestimmten, der aber bei einer Nachuntersuchung als Galaktosamin identifiziert werden konnte (Tabelle 1, Seite 15).

Auch NITSCHMANN und HENZI (41) gaben an, Glukosamin gefunden zu haben stimmen aber jetzt mit uns überein (persönliche Mitteilung von Professor NITSCHMANN), daß es sich um Galaktosamin handelt.

Tabelle I: Quantitative Analyse von Glyko-makropeptiden

Die Werte für Zucker, N und P sind angegeben in % bezogen auf das Gesamtpeptid, die Werte für Aminosäuren sind angegeben in % bezogen auf den Peptidanteil.

I: gewonnen mit Lab

II: gewonnen mit Lab. Werte angegeben von NITSCHMANN und HENZI (41) für ihr Präparat GMP (b) 1

III: gewonnen mit Lab. Ein Präparat von NITSCHMANN und HENZI, von uns mit untersucht

IV: gewonnen mit Pepsin

Präparat	I	II	III	IV
Galaktosamin	3,8	3,4+	3,0	3,6
Neuraminsäure	25,6	10,0	10,9	16,9
Galaktose	7,5	9,4	6,4	8,2
Xylose	-	-	4,5	-
Total	36,9	22,7	25,2	28,7
N	11,6	10,8	-	12,0
P	0,7	0,25	-	0,8
Asp	7,5	8,4	7,7	7,9
Glut	18,0	18,8	18,6	15,2
Ser	10,2	7,9	9,6	7,5
Threo	17,6	16,9	18,0	17,9
Prol	11,6	11,8	10,0	13,6
Val	8,8	8,9	9,5	7,9
Leu	1,9	1,9	2,2	2,8
Isoleu	9,3	10,6	9,4	7,7
Ala	7,3	6,1	8,7	11,8
Gly	1,9	1,1	1,8	1,2
Lys	5,8	6,1	5,0	6,8

+ Von NITSCHMANN und HENZI als Glucosamin angegeben

DISKUSSION

Wir gingen von der Frage aus, ob die Abspaltung eines Glykomakropeptids aus dem Casein, wie sie bei der Labung von Caseinatlösungen beobachtet wurde, spezifisch für die Primärreaktion der Milchgerinnung ist. Unter identischen Versuchs- und Aufbereitungsbedingungen konnte nach Pepsineinwirkung ein Peptid isoliert werden, das qualitativ mit dem nach Labung dargestellten Peptid identisch, und wie dieses ein Glykomakropeptid ist. Der Peptidanteil beträgt in beiden Fällen, von Präparat zu Präparat schwankend, 60 bis 65%.

Die Daten der quantitativen Aminosäurenbestimmung der drei mit Lab gewonnenen Glykomakropeptide stimmen recht gut überein; die Schwankungen sind kaum größer als von anderer Seite beschrieben (41). Die Analysenwerte für das mit Pepsin gewonnene Präparat weichen in Glutaminsäure und Alanin etwas stärker ab. Ob es sich hierbei um Analysenfehler oder um tatsächliche Unterschiede handelt, vermögen wir vorerst noch nicht sicher zu entscheiden, da nur eines unserer mit Pepsin erhaltenen Präparate bisher quantitativ untersucht wurde. Immerhin glauben wir uns zu der Aussage berechtigt, daß das mit Pepsin aus Casein abgespaltene Glykomakropeptid dem mit Lab gewonnenen Präparat in seinem Peptidanteil sehr ähnlich, wenn nicht mit diesem identisch ist.

Bezüglich des Zuckeranteils schwanken die Werte schon mit Lab von Präparat zu Präparat erheblich (41), besonders für Neuraminsäure, so daß sich diese Ergebnisse nur in qualitativer Hinsicht für einen Identitätsbeweis heranziehen lassen.

So geben NITSCHMANN und HENZI (41) für vier verschiedene durch Lab gewonnene Glykomakropeptide einen Neuraminsäuregehalt von 3,6 bis 11,4% an und BRUNNER und THOMPSON (12) einen von 11,3%. Daß unsere Werte absolut höher liegen, kann die Ursache darin haben, daß NITSCHMANN und HENZI keine N-Acetylneuraminsäure in Substanz zur Verfügung hatten und deshalb eine von BÖHM (9) veröffentlichte Eichkurve benutzen mußten. Bei

ihrer Unbeständigkeit gegen saure Hydrolyse ist es aber notwendig, daß die Eichkurve unter den gleichen Bedingungen wie die der Hydrolyse aufgenommen wird.

Bisher wurde von den verschiedenen Autoren (41, 24) als Aminozucker Glucosamin angegeben. Mit der beschriebenen Methode konnten wir uns jedoch davon überzeugen, daß es sich um Galaktosamin handelt. In dem von uns mit untersuchten Präparat von NITSCHMANN und HENZI fanden wir darüber hinaus eine Pentose, die als Xylose identifiziert wurde. Die anderen Präparate sind noch nicht auf Pentosen untersucht.

Auf eine Beobachtung soll noch besonders hingewiesen werden. Bei der Darstellung der Glykomakropeptide aus Casein fanden wir mit Pepsin immer eine um etwa 50% geringere Ausbeute als mit Lab. Eine Erklärung hierfür haben wir noch nicht.

MATTENHEIMER und NITSCHMANN (36) hatten aus ihren Versuchen mit Proteasen, die bei pH 6.8 die Milch zur Gerinnung bringen, gefolgert, daß die Primärreaktion der Gerinnung, gemessen an der Abspaltung von NPN, mit allen diesen Enzymen ein sehr ähnlicher Vorgang sein müsse. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, wonach die mit Lab und Pepsin bei pH 6.8 von Casein abgespaltenen Glykomakropeptid außerordentlich ähnlich, wenn nicht identisch sind, wurde diese These wesentlich gestützt.

Es bleibt die Frage offen, ob Lab und Pepsin den gleichen Angriffspunkt beim Auslösen der Primärreaktion am Casein haben. Die Unterschiede im Gehalt der Peptide an Glutaminsäure und Alanin könnten dagegen sprechen. Mit Casein als Substrat hat Pepsin nach Berichten in der Literatur bei pH 6.4 eine stärkere proteolytische Aktivität als Lab. CERBULIS, CUSTER und ZITTLE (13) fanden bei 5 Minuten Inkubation von Lab und Pepsin mit α-Caseinat fast identische Elektropherogramme der Peptidfraktion. Die Enzymmenge war so gewählt, daß in Gegenwart von Calciumionen die Gerinnung nach einer Minute eintrat. Wurde aber 3 Stunden inkubiert, so ließen die Ergebnisse auf stärkere Proteolyse durch Pepsin schließen. Die Autoren berichten weiter, daß sie das Glukomakropeptid von NITSCHMANN und HENZI

(41) isoliert haben, machen aber keine näheren Angaben. Auch β-Casein wird bei pH 6.4 von Pepsin stärker hydrolisiert als durch Lab. Die Spaltprodukte verhielten sich aber bei der Elektrophorese ähnlich (14). Bei Abbauversuchen an der B-Kette des Insulins durch Lab und Pepsin fand FISH (17) identische Bruchstücke.

Unterschiede in der proteolytischen Spezifität von Lab und Pepsin stehen keineswegs im Widerspruch zur Identität der Primärreaktion der Milchgerinnung mit beiden Enzymen. Die Primärreaktion ist verglichen mit der unspezifischen Proteolyse ein sehr rasch ablaufender Vorgang (36).

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der durch Pepsin katalysierten Primärreaktion der Milchgerinnung wird vom Casein ein Peptid abgespalten, das aus der in 12%iger Trichloressigsäure löslichen Nicht-Protein-Stickstoff (NPN)-Fraktion isoliert wurde. Das Peptid wurde als Glykomakropeptid erkannt. Es enthält 12% N, und 0.8% P. Der Peptidanteil beträgt 60 - 65 % und ist aus folgenden Aminosäuren zusammengesetzt: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Lysin, Alanin, Threonin, Valin, Leucin, Isoleucin und Prolin.

Im Zuckeranteil werden N-Acetylneuraminsäure, Galaktosamin und Galaktose gefunden.

Qualitativ ist das mit Pepsin gewonnene Glykomakropeptid mit dem nach Laberinwirkung auf Casein isolierten Glykomakropeptid in der Zusammensetzung identisch. Die quantitative Bestimmung der Bestandteile zeigt geringe Unterschiede, die wenigstens teilweise auf experimentellen Fehlern beruhen können. Somit scheinen das "Pepsin-peptid" und das "Lab-Peptid" einander sehr ähnlich, wenn nicht identisch zu sein, und es wird gefolgert, daß bei der Milchgerinnung durch Pepsin und durch Lab die gleiche Primärreaktion abläuft.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Caseinherstellung

4 l frische Milch werden zentrifugiert, entfettet und bei Zimmertemperatur mit 3 l 0,05 n HCl tropfenweise unter Rühren während 3 Stunden versetzt (End-pH 4,6). Das gefällte Casein wird 5 mal mit aq.dest. gewaschen und zentrifugiert, anschließend in 2 l 60%igem Äthanol 1/2 Stunde unter ständigem Rühren suspendiert, abzentrifugiert und für weitere 3 Stunden in 96%igem Äthanol gerührt. In 2 l 99%igem Äthanol wird das Casein über Nacht im Eisschrank stehen gelassen, am nächsten Tage 3 mal mit je 2 l Äther gewaschen und dann getrocknet.

2. Aufnahme der NPN-Zeitkurven mit Lab und Pepsin und Darstellung der Lab- und Pepsinpeptide

Prinzip: Die Primärreaktion kann man chemisch durch den Anstieg des in TCE löslichen NPN verfolgen, der bis zum Eintritt der Gerinnung rasch erfolgt, und dann nicht mehr nennenswert zunimmt. Bei dieser Primärreaktion werden die gesuchten Peptide freigesetzt.

Methodisches:

Fermente: Lab, Handelspräparat der Fa. Marshall, Madison, Wisconsin, USA
Lab, kristallisiert
Pepsin,kristallisiert, Fa. Park & Davis, Detroit, USA
Na-Caseinatlösung wurde für alle Versuche in 4%iger Lösung verwendet:
4 g luftgetrocknetes Casein wird unter Rühren mit ca. 19 ml 0,1 n NaOH und Wasser ad 100,0 gelöst.

Zur Feststellung des wirklichen Wassergehaltes wurden einige Male im Exsikkator und an der Luft getrocknetes Casein verascht, der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmung und aus der Differenz des N-Gehaltes der Wassergehalt errechnet. Er betrug im Durchschnitt 20 %.

Ca-Caseinatlösung: 0,1 ml 0,4 n $CaCL_2$ - Lösung pro 1 ml 4%iger Na-Caseinlösung.

Versuchsbedingungen: Mischungsverhältnis Substratlösung : Fermentlösung = 10 : 1. Reaktionstemperatur 30° C. Gerinnungsversuche an einer Ca-Caseinatlösung wurden unter den gleichen Bedingungen ebenfalls bei 30°C ausgeführt. Zeitablesung in dem Moment, in dem sich die ersten Flocken am Rande des Reagenzglases zeigten. Die Fermentkonzentration wurde so gewählt, daß die Gerinnungszeit durchschnittlich 10 bis 15 Min. betrug.

Elektrophorese: Papier Schleicher-Schüll 2043 b
Na-Veronalpuffer pH 7,6 - 7,8, 220 V, 4 Stunden
Chromatographie: Papier Schleicher-Schüll 2043 b
Butanol: Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5 aufsteigend, bei Zimmertemperatur 10 bis 12 Stunden.
Ninhydrinreagenz zum Besprühen nach LEVY: 0,1 g Ninhydrin, 50 ml Äthanol, 15 ml Eisessig und 2 ml Collidin. Nach dem Besprühen Entwickeln bei 105° für 10 Min.

Aufnahme der NPN-Zeitkurven: Die Konzentration der Fermentlösungen wird so gewählt, daß in den Vorversuchen 0,1 ml Fermentlösung 1 ml Ca-Caseinatlösung in ca. 15 Min. zur Gerinnung bringt.

Zur Aufnahme der NPN-Zeitkurven wurden mehrere Gefäße mit 5 ml 4%iger Na-Caseinatlösung in ein Wasserbad von 30° gebracht, 0,5 ml Fermentlösung hinzugetan, umgeschüttelt und im Abstand von 1 - 5 Minuten mit 11 ml 18%iger TCE gefällt. Dann wurde filtriert, 10 ml des Filtrates verascht und der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden gegen die Inkubationszeit aufgetragen (Abb. 1, S. 21).

Darstellung der Peptide: Für die Peptidgewinnung wurde die Na-Caseinatlösung für 10 Min. bei 80° erhitzt, abgekühlt und eine kleine Probe zur Bestimmung der Gerinnungszeit entnommen. Danach wurden jeweils 300 ml der Caseinatlösung gelabt und nach der doppelten Gerinnungszeit mit dem doppelten Volumen 18%iger TCE deproteinisiert. Das Filtrat wurde dreimal mit dem

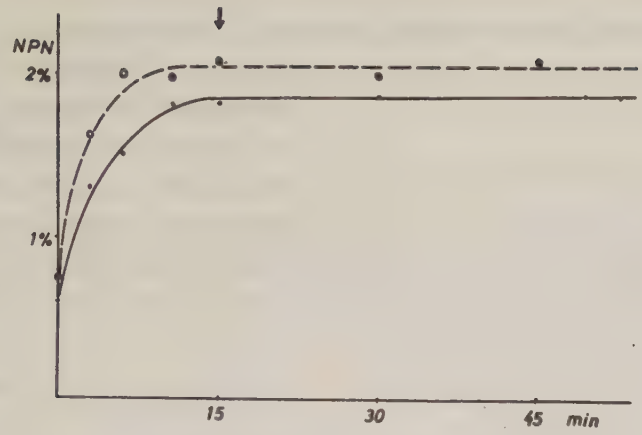


Abb. 1: NPN-Abspaltung durch Lab (——) und Pepsin (– – – –) ↓ Eintritt der Gerinnung

gleichen Volumen Äther extrahiert und mit 0,1 n NaOH neutralisiert. Anschließend wurde die Lösung wiederum unter ständigem Rühren 10 Min. auf 80° C erhitzt und nach dem Erkalten in breite Dialysierschläuche gefüllt und ca. 24 Stunden bei ungefähr 10°C unter häufigerem Wasserwechsel dialysiert. Zur Einengung des großen Volumens wurde folgende Apparatur benutzt (Abb. 3). In den Hals einer 10 l Flasche, deren Boden entfernt worden war und die umgekehrt auf einem Dreifuß stand, wurde ein Föhn gesteckt, der von unten bei einer Raumtemperatur von 10°C kalte Luft gegen die in der Flasche befindlichen Dialysierschläuche blies. Nach 8 - 10 Stunden war

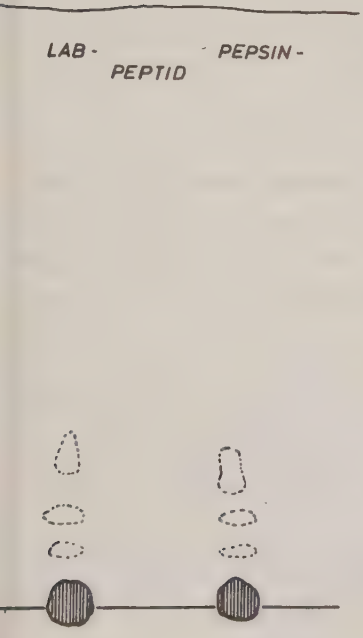


Abb. 2: Reinheitsprüfung der Glykomakropeptide
Lösungsmittel: Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5
Angefärbt mit Ninhydrin.

das Volumen auf ca. 1/5 - 1/6 eingeengt. Die Lösung wurde nun in sehr schmale Dialysierschläuche umgefüllt, ungefähr 40 - 80 Stunden weiter dialysiert und wiederum auf ca. 1/4 ihres Volumens eingeengt. Von dieser Lösung wurden Proben entnommen und ihre Reinheit chromatographisch (Abb. 2, S. 21) und elektrophoretisch (Abb. 4) geprüft. War der Reinheitsgrad zufriedenstellend, wurde die Lösung gefriergetrocknet.

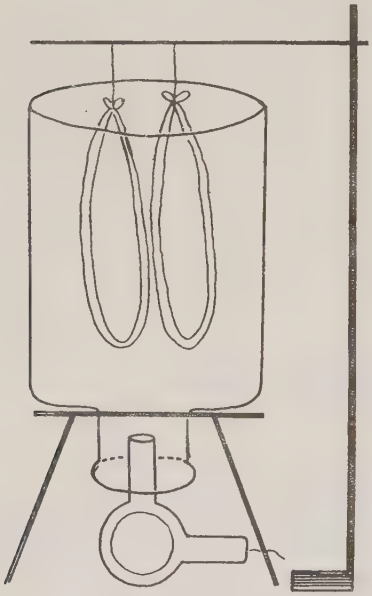


Abb. 3: Apparatur zur Einengung des Volumens.

3. Stickstoffbestimmung mit Nesslers-Reagenz und nach Kjeldahl

Für die Bestimmung des Stickstoffs wurde zuerst nach einer von BOHREN (10) angegebenen Methode mit Nesslers-Reagenz gearbeitet, die bei einer Konzentration von 6 - 20 γ N/ml Ansatz mit einer Genauigkeit von $\pm$ 2 % arbeiten sollte.

Die Proben (höchstens 1 ml und 20 γ N-Gehalt) werden in Jenaer Reagenzgläsern mit 0,15 ml Aufschlußreagenz versetzt (konz. H_2SO_4 : H_2O = 1 : 1 mit 0,1 % $HgCl_2$) und in einem Reagenzglasständer auf eine elektrische

Abb. 4: Elektrophorese der Glykomakropeptide.
Na-Veronalpuffer pH 7,8, 220 V, Laufzeit 4 Stunden

Kochplatte gesetzt. Nach dem Verdampfen des Wassers und Zufügen von wenigen Tropfen H_2O_2 wird die Veraschung für 2 Stunden fortgesetzt. Danach werden die Proben mit 5 ml H_2O aufgefüllt und 2 ml Nesslers-Reagenz zugefügt. Da der Farbstoff nicht stabil ist, muß 5 bis 20 Minuten danach bei 402 mμ gemessen werden.

Vorschrift für das Nesslers-Reagenz:

142 g NaOH in 1,22 l H_2O lösen, 42 g KJ in 28 ml H_2O lösen, 31,5 g J_2, 42 g Hg rein, J_2 zur KJ-Lösung geben. Wenn es gelöst ist, Hg zufügen und schütteln bis die Farbe gelb-orange wird. Einstellen der Lösung durch tropfenweise Zugabe einer KJ/J_2-Lösung bis 2 Tropfen der Lösung zu 4 Tropfen 1%iger Stärkelösung gegeben gerade Blaufärbung ergibt. Mit H_2O wird diese Lösung auf 280 ml verdünnt und zur NaOH-Lösung gegeben, eine Woche stehen gelassen, filtriert und zur Verhinderung von Kristallausscheidungen 4 g NaJ zugegeben.

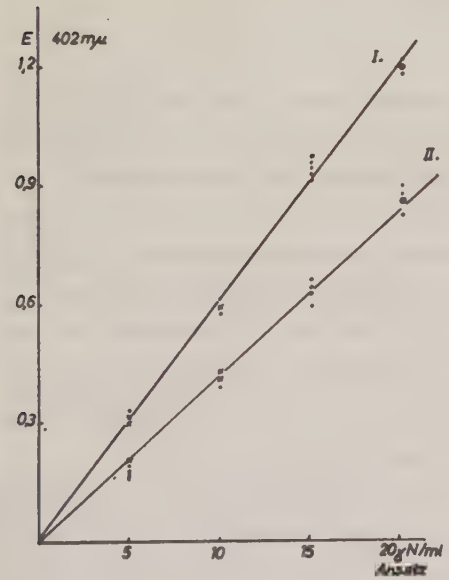


Abb. 5: Glycinveraschungskurve (Methode n. BOHREN (10)) Kurve I aufgefüllt mit 0,5%iger Gummiarabicum-Lösung. Kurve II aufgefüllt mit Wasser.

Die von BOHREN (10) angegebene Methode, die Farbe in denselben optisch ausgewählten Reagenzgläsern zu messen, ergibt zu große Fehler. Aber auch beim Messen in Küvetten waren die Ergebnisse unbefriedigend. Die Fehlerbreite war wesentlich höher als ± 5 % (s. Abb. 5), und vor allem war die Reproduzierbarkeit schlecht. Um öfter auftretende Trübungen zu vermeiden, wurde nach der Veraschung statt mit 5 ml Wasser mit der gleichen Menge 0,5 - 1%iger Gummiarabicumlösung aufgefüllt. Die Extink-

tion für die einzelnen Werte waren höher (s. Abb. 5, Kurve I) und temperaturabhängig. Trübungen traten nicht auf, doch war die Reproduzierbarkeit ebenfalls unbefriedigend. Diese Versuche wurden beendet, als auf eine private Nachfrage bei BOHREN in Bern bestätigt wurde, daß auch bei ihm weitere Versuche mit dieser Methode keine befriedigenden Ergebnisse gezeigt hatten.

Für die N-Bestimmung in den Peptiden wurde auf die Kjeldahl-Methode zurückgegriffen. Veraschung von je 4 - 8 mg Peptid mit 4 ml Veraschungssäure (konz. H_2SO_4 : H_2O = 1 : 1) und Hg-Se-Katalysator. N-Bestimmung nach Kjeldahl, Titration mit 0,01 n H_2SO_4.

4. Phosphatbestimmung

Unserer Bestimmung lag die von K. LOHMANN und L. JENDRASSIK (35) modifizierte Methode von FISKE-SUBBAROW (18) zu Grunde, die wir für unsere Zwecke noch weiter umwandelten, da es durch die Veraschungssäure zu einer erheblichen pH-Verschiebung kam, die zu einer Störung der Farbentwicklung führte. Es wurde deshalb eine Neutralisation mit konz. NH_3 in Gegenwart von p-Nitrophenol als Indikator eingefügt. Die dadurch bedingte starke Erhöhung der Ionenkonzentration war für unsere Ergebnisse ohne Bedeutung, die Eichkurven wurden unter gleichen Bedingungen gemacht.

Methodisches: Fiske-Subbarow-Reagenz: 0,5 g 1-Amino-2-naphthol-4-sulfonsäure werden in 195 ml 15%iger $NaHSO_3$-Lösung gelöst. (27,5 g $Na_2S_2O_5$ in 200 ml Wasser). Dazu werden 5 ml 20%ige Na_2SO_3-Lösung getan. Das Reagenz ist mehrere Wochen haltbar. Es muß gut verschlossen und vor Licht geschützt aufbewahrt werden. Für die Eichkurven wurde als Stammlösung 438,8 mg KH_2PO_4 (entspricht 100 mg P) in 1000 ml Wasser gelöst. Die Extinktionen wurden bei 578 mμ (s. Abb. 6, Kurve II, S. 25) oder besser bei 700 mμ (s. Abb. 6, Kurve I, S. 25) gemessen. Veraschungssäure: konz. H_2SO_4 : 65 % HNO_3 = 1 : 1. Hg-Se-Katalysator. Veraschungsdauer 1 1/2 Stunden.

Die Versuche: Je 5 bis 10 mg Peptid, 1 ml Veraschungssäure, 3 Glasperlen und eine Mikrospatelspitze Katalysator werden in einem Kjeldahlkolben verascht. Nach Verschwinden der Gasentwicklung werden weitere 0,5 ml Veraschungssäure zugesetzt und nach Ende der Veraschung mit 5 ml Wasser für 5 Min. aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit konz. NH_3 und p-Nitrophenol als Indikator neutralisiert und in 25 ml Kölbchen übergespült und 1 ml 10 n H_2SO_4, 2,5 ml 2,5%-ige Ammoniummolybdatlösung und 1 ml Fiske-Reagenz hinzugefügt. Mit aq. dest. wurde auf 25 ml aufgefüllt, geschüttelt, 15 Min. bei 60° im Wasserbad stehen gelassen und bei 700 mμ gemessen.

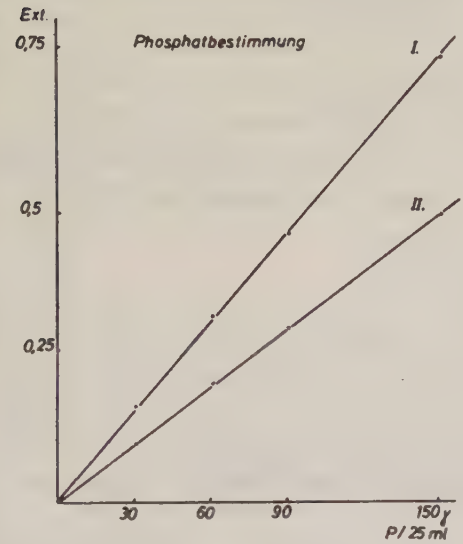


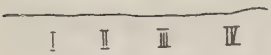
Abb. 6: Phosphatbestimmung
Kurve I Extinktion bei 700 mμ
Kurve II Extinktion " 578 mμ

5. Qualitative und quantitative Zuckerbestimmungen

a. Galaktose

Zur qualitativen Bestimmung der Galaktose wurden ca. 1 mg der Peptide mit 2 ml 0,5 n HCl 16 Stunden bei 105° C hydrolysiert, das Volumen der Hydrolysate im Vakuum eingeengt, zur Chromatographie aufgetragen und der Zucker mit Hilfe von Testsubstanzen als Galaktose identifiziert (Abb. 7, S. 26).

Die quantitative Bestimmung wurde mit dem Anthronreagenz durchgeführt (16). Da die einzelnen Zucker sehr unterschiedlich damit reagieren (28) und die Farbentwicklung und Farbintensität von der Zeit einer Erwärmung auf 100° C abhängen, wurden zunächst die besten Bedingungen für unsere Bestimmungen gesucht. Zuerst wurde die Abhängigkeit der Farbentwicklung von der Zeit der Erwärmung auf 100° C (Abb. 8, S. 26) und der Anthronkon-



zentration (Abb. 9, S.27) untersucht und eine Eichkurve (Abb. 10, S. 27) angefertigt.

Die Galaktose wurde direkt im Peptid und nach dessen Hydrolyse bestimmt. Ohne Hydrolyse wurde nur ca. 40% der Menge gefunden, die nach der Hydrolyse nachgewiesen werden konnte.

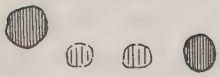
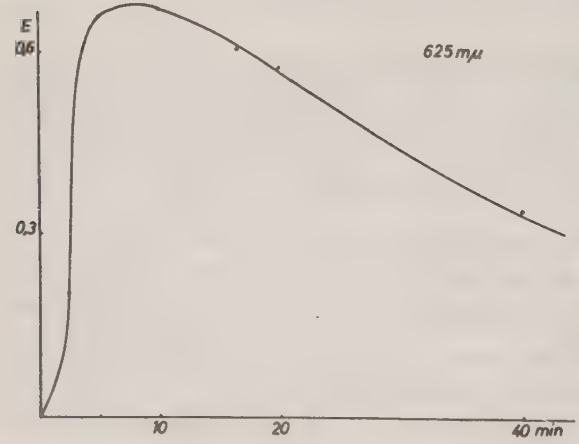


Abb. 7: Galaktosechromatogramm

Lösungsmittel: 2-Pentanol : Pyridin : Wasser = 8 : 8 : 7
Angefärbt mit Anilinphthalat n. PARTRIDGE (43). Laufzeit 17 1/2 Stunden
I Glucose IV Galaktose
II Lab- III Pepsinpeptidhydrolysat

Versuche:

Anthronreagenz: 0,2 g umkristallisiertes Anthron in 96%iger H_2SO_4 gelöst.



2 ml dieser Lösung werden zu 1 ml der zu untersuchenden Lösung im Eisbad zugegeben, 5 Min. auf 100° C erhitzt, wieder in das Eisbad gestellt und bei 625 mμ (oder 578 mμ) gemessen.

Abb. 8: Abhängigkeit der Farbentwicklung von der Zeit der Erwärmung auf 100° C 60 γ Galaktose/ml

1. Bestimmungen in den Peptiden direkt: Ca. 5 mg der Peptide werden in 5 ml Wasser gelöst. In einer Dreifachbestimmung werden 3 mal je 1 ml dieser Lösung wie oben angegeben behandelt.

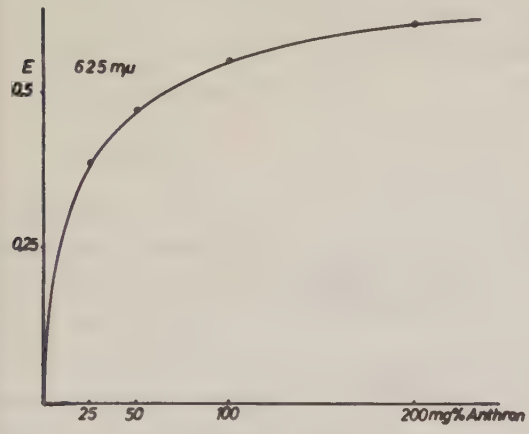


Abb. 9: Abhängigkeit der Farbentwicklung von der Anthronkonzentration. 30 γ Glucose/ml

2. Bestimmung nach Hydrolyse: Ca. 5 mg der Peptide werden in 5 ml Wasser gelöst. 3 mal je 1 ml dieser Lösungen werden mit 1 ml 1 n HCl versetzt, in Glasröhrchen eingeschmolzen und 16 Stunden bei 105° C erhitzt.

Zu den hydrolysierten Proben werden je 4 ml Anthronreagenz zugegeben und wie oben angegeben verfahren.

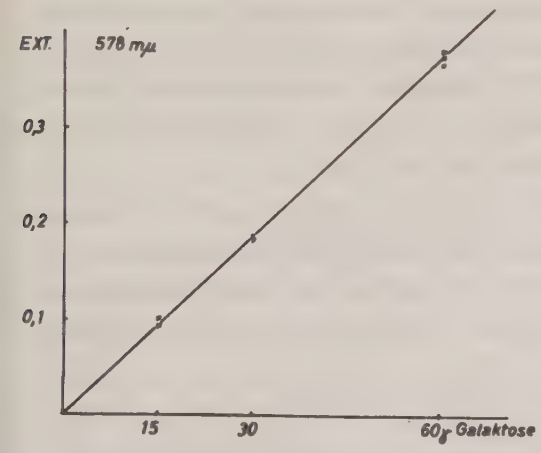


Abb. 10: Galaktoseeichkurve
Einzelheiten siehe S. 26

b. N-acetyl-Neuraminsäure
Die Hauptschwierigkeit der N-Acetyl-Neuraminsäurebestimmung liegt in der leichten Zersetzlichkeit der Substrate bei saurer Hydrolyse. Bei ihrer Bestimmung direkt im Peptid wird nur ein kleiner Teil erfaßt (ca. 30 %), während sie nach der Hydrolyse zum größten Teil unter Huminbildung zerstört ist. Die schonendste Hydrolyse ist die mit 5%iger methanolischer HCL.

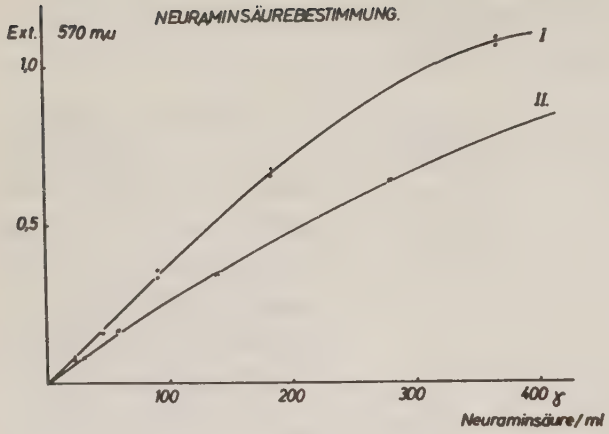


Abb. 11: Eichkurven für die Neuraminsäurebestimmung.
I nicht hydrolysiert
II hydrolisiert
Erklärung siehe untenstehenden Text.

Da uns etwas N-Acetylneuraminsäure zur Verfügung stand, konnten wir die Eichkurve und die Bestimmung nach Hydrolyse der Peptide unter gleichen Bedingungen durchführen. Der Bestimmung lag die Analysenvorschrift von BÖHM (10) zugrunde. Bials Reagenz: 100 mg Orcin, 40,7 ml konz. HCl, 1 ml 1%ige $FeCl_3$-Lösung und aqua dest. ad 50,0 ml.

1 ml der zu untersuchenden Lösung, 2 ml Bials-Reagenz und 1 ml Wasser werden 15 min im kochenden Wasserbad erhitzt, unter dem Wasserhahn abgekühlt und mit 5 ml Amylalkohol ausgeschüttelt. Die alkoholische Lösung wird zentrifugiert, um die restlichen Wassertropfen zu entfernen und dann bei 570 mμ gemessen.

Versuche:

1. Direkt im Peptid: Ca. 4 mg der Peptide werden in 4 ml Wasser gelöst und nach Vorschrift behandelt (je 1 ml).

2. Bestimmung nach Hydrolyse: Ca. 3 mg Peptid + 1 ml 5%iger methanolischer HCl werden 95 min. bei 100 C im Trockenschrank hydrolysiert. Da-

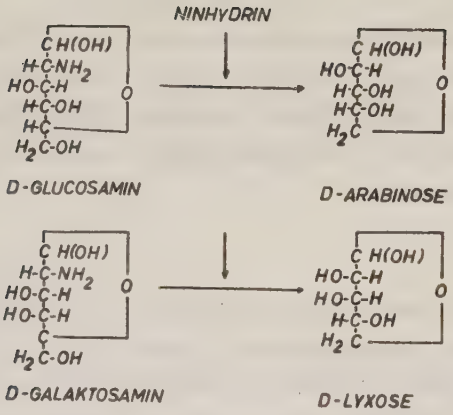
nach werden 2 ml Wasser zugetan und von dieser Lösung je 1 ml zur Bestimmung (s. o.) verwendet.

3. Eichkurven: Für beide Bestimmungen wurden unter gleichen Bedingungen Eichkurven angefertigt. (Abb. 11, I und II, S. 28). Durch die Hydrolyse wird ca. 1/3 der Neuraminsäure zerstört. In der Stammlösung I (ohne Hydrolyse) waren 730 γ Neuraminsäure/ml, in der Stammlösung II (nach Hydrolyse) waren 560 γ Neuraminsäure/ml.

c. Galaktosamin

Galaktosamin wurde wie folgt papierchromatographisch identifiziert (22). Nach Hydrolyse der Peptide in zugeschmolzenen Teströhrchen mit 1 n H_2SO_4 für 3 Stunden bei 100° C wurden die Hydrolysate nacheinander durch eine Säule von IR-45 (OH^-) und eine Säule von Dowex-50 (H^+) gegeben unter jeweiligem Nachwaschen mit Wasser. Die mit dem Waschwasser kombinierten durchgetretenen Lösungen wurden gefriergetrocknet und daraus die Galaktose papierchromatographisch identifiziert. Zum Nachweis des Aminozuckers wurde die Dowex-50-Säule mit 0,5 n HCl eluiert und die Eluate zur Vertreibung der HCl im Vakuum eingeengt. Die Einengung wurde nach Zugabe von etwas Wasser mehrmals wiederholt und die Substanz schließlich im Vakuum getrocknet. Die getrockneten Substanzen wurden in wenig Wasser gelöst und mit n-Butanol : Pyridin : 0,25 n HCl (5 : 3 : 2 v/v) für 48 Stunden auf Papier chromatographiert. Galaktosamin wurde nachgewiesen. Um es als solches sicher zu identifizieren, wurde es auf dem Papier mit Ninhydrin oxydiert und dann weiter für 20 Stunden mit n-Butanol : Pyridin : Wasser (5 : 3 : 2) chromatographiert. Als Oxydationsprodukt wurde Lyxose gefunden und damit die Identität des Aminozuckers mit Galaktosamin sichergestellt (siehe Abbildung, S. 31).

Die Oxydation der Hexosamine zu den entsprechenden Pentosen ist in den folgenden Formeln dargestellt. Neben der oxydativen Desaminierung wird C abgespalten.



Quantitativ wurde der Aminozucker nach der Methode von Richard J. WINZLER (51) bestimmt.

Acetylaceton-Reagenz: 1 ml Acetylaceton in 50 ml 0,5 n Na_2CO_3; Lösung jedesmal frisch bereiten.

Ehrlichs-Reagenz: 0,8 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 30 ml konz. HCl und 30 ml Methanol gelöst.

Hydrolyse: 5 bis 10 mg Peptid werden in zugeschmolzenen Röhrchen 4 Stunden im kochenden Wasserbad mit 2 ml 3 n HCl hydrolysiert. Nach dem Neutralisieren mit 4n NaOH gegen Lackmus wird die Lösung auf 5 ml verdünnt. Zu 1 ml dieser Lösung wird 1 ml Acetylaceton-Reagenz gegeben und gemischt. Zukorken mit Glasstöpseln und 15 min in ein kochendes Wasserbad. Nach Abkühlen im Wasserbad werden 5 ml 95%igen Äthanols hinzugetan sowie 1 ml Ehrlichs-Reagenz und mit 95%igem Äthanol auf 10 ml verdünnt. Nach 30 min wird bei 530 mμ gemessen.

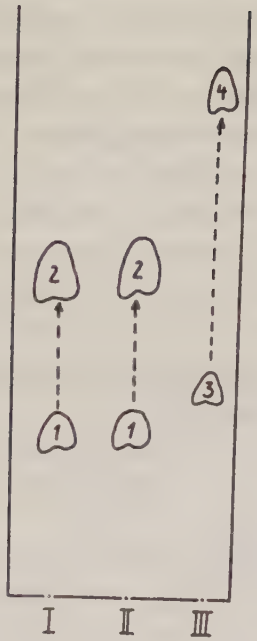


Abb. 12: Identifizierung des Aminozuckers im Glykomakropeptid. (Einzelheiten s. Text)

I D-Galaktosamin
II Pepsinpeptidhydrolysat
III D-Glucosamin
1. D-Galaktosamin
2. D-Lyxose
3. D-Glucosamin
4. D-Arabinose
←------ Wanderung nach Oxydation

6. Qualitative Aminosäureanalyse

Die Hydrolyse wurde nach der von H. ZAHN (52) angegebenen Methode durchgeführt. Ca. 5 mg der Peptide werden mit 2 ml 6 n HCl in einem zugeschmolzenen Glasröhrchen auf 110° C für 20 Stunden erhitzt. Nach dem Erkalten wird der Inhalt in ein Reagenzglas überführt, das mit einem Stopfen und Spritzfänger versehen und evakuiert wird, wobei sich das Glas in einem Wasserbad von 100° C befindet und etwas geschüttelt wird. Nachdem der Inhalt getrocknet ist, wird noch 90 Min. lang durch das Reagenzglas Luft gesaugt. Der Rückstand wird in 0,5 ml Wasser aufgenommen und von den durch die Hydrolyse entstandenen Huminen abzentrifugiert.

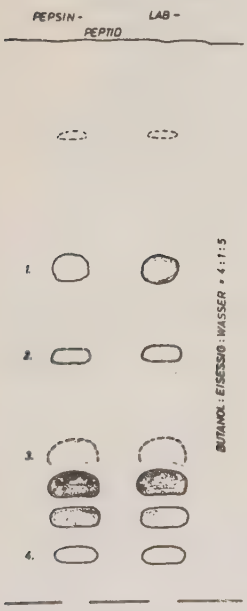


Abb. 13: Eindimensionales Chromatogramm der Peptidhydrolysate. Einzelheiten s. Text.

Die Chromatographie wurde nach der von A. L. LEVY (31) angegebenen zweidimensionalen Methode durchgeführt.

Beide Richtungen aufsteigend.

Lösungen: 1. Richtung: Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5

2. Richtung: Phenol : m-Cresol : Boratpuffer pH 9,3 = 25 g : 25 g : 7 ml.

Boratpuffer pH 9,3 : 0,1 m Borsäure + 113 ml 0,1 n NaOH.

Ninhydrinreagenz: 0,1 g Ninhydrin, 50 ml Äthanol 15 ml Eisessig und 2 ml Collidin.

Chromatographiepapier Schleicher-Schüll 2043 b

Zeit: 1. Richtung ca. 20 Stunden; 2. Richtung ca. 30 - 35 Stunden; beides bei Zimmertemperatur.

Versuche:

Für eine erste Orientierung wurde für ein eindimensionales Chromatogramm 0,05 ml der Peptidhydrolysate aufgetragen und mit Lösung 1 laufen gelassen. Da die Trennung nicht genügte, wurden für ein zweidimensionales Chromatogramm 0,1 ml der Hydrolysate aufgetragen, die erste Richtung laufen gelas-

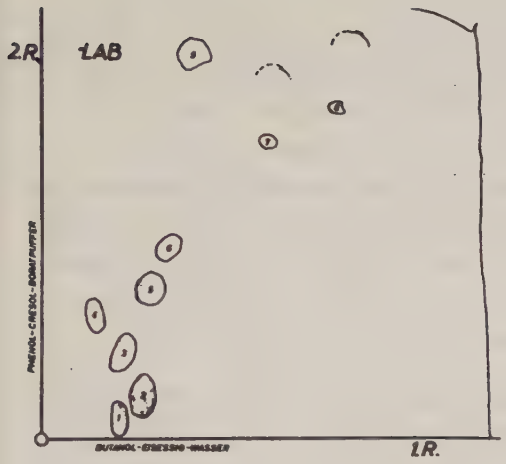


Abb. 14: Zweidimensionales Chromatogramm des Labpeptidhydrolysates. Einzelheiten s. Text.

1. Asparaginsäure
2. Glutaminsäure
3. Serin
4. Lysin
5. Alanin
6. Threonin
7. Valin
8. Leucin-Isoleucin
9. Prolin

sen und das Chromatogramm getrocknet. Danach wurde die Seite mit den Aminosäuren durch dicke Lagen Filtrierpapier abgedeckt und das Chromatogramm mit dem Boratpuffer pH 9,3 besprüht. Nach dem Zwischentrocknen wurde es in der zweiten Richtung entwickelt, getrocknet und mit Ninhydrin besprüht.

Die einzelnen Flecke wurden auf Grund vorheriger R_f-Wertbestimmungen identifiziert.

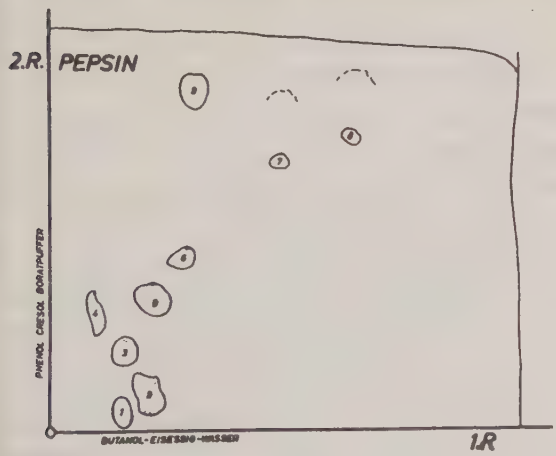


Abb. 15: Zweidimensionales Chromatogramm des Pepsinhydrolysates. Einzelheiten s. Text. Identifizierung der einzelnen Aminosäuren s. Abb. 14.

7. Versuche zur quantitativen Aminosäuren-Papierchromatographie

Unter Benutzung der Arbeiten von F. SANGER (45), MOORE und HEIN (46) und A. L. LEVY (32) wurde versucht, die Aminosäuren der Peptidhydrolysate in ihre Dinitrophenylderivate (DNP-) zu überführen. Diese sollten papierchromatographisch getrennt, eluiert und photometrisch gemessen werden. Als Vergleichssubstanzen wurden die DNP-Derivate der einzelnen Aminosäuren nach Kombination der Methoden von E. ABDERHALDEN (1) und A. L. LEVY (32) hergestellt, da wir keinen Jacobsen - Léonis - Autotitrator zur Verfügung hatten, wie er von A. L. LEVY (32) verwendet worden war. Als Beispiel sei die Darstellung des DNP-Glycins angeführt:

200 mg Glycin und 400 mg $NaHCO_3$ werden in 5 ml Wasser gelöst und zu 400 mg (0,28 ml) Dinitrofluorbenzol (DNFB) gegeben, das in 10 ml abs. Alkohol gelöst worden war. Alles zusammen wird 2 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt und danach der Alkohol durch Erwärmen auf 80° C unter gleichzeitigem Saugen entfernt. Der Rückstand wird in Wasser gelöst und zweimal mit Äther ausgeschüttelt, um nicht umgesetztes DNFB zu entfernen. Die wäßrige Phase wird nun mit 2 n HCl angesäuert und 4 mal mit Äther geschüttelt. Diese Ätherphasen werden auf dem Wasserbad eingedunstet und die Rückstände in warmem Methanol gelöst und nach Zugabe von Wasser im Kühlschrank zur Auskristallisation gebracht. Nach nochmaligem Umkristallisieren betrug die Ausbeute 333 mg. Von dieser wie auch den anderen hergestellten DNP-Aminosäuren wurden Teile in Aceton gelöst und von diesen Lösungen Mengen auf Chromatographiepapier aufgetragen, die einem DNP-Aminosäuregehalt von 1,25 - 25 γ entsprechen. Über diese aufgetragenen Flecken werden die für die zweidimensionale Chromatographie von A. L. LEVY (32) angegebenen Lösungsmittel laufen gelassen. (1. Richtung: Toluol : Chloräthanol : Pyridin : 0,8 n NH_3 = 5 : 3 : 1,5 : 3; 2. Richtung: 1,5 m Phosphatpuffer (1 m NaH_2PO_4 + 0,5 m Na_2HPO_4)), nach dem Trocknen die Flekken ausgeschnitten, zerkleinert und durch Zugabe von 4 ml 1%iger $NaHCO_3$ in Reagenzgläsern eluiert. Anschließend wird die Extinktion bei 366 mμ gemessen.

Wenn man von einem Aminosäurengemisch ausging und dieses in die DNP-Derivate überführte und chromatographierte, so war die Trennung gut. Die Fehlergrenze lag allerdings bei ± 10 - 15 % ! Wurde aber versucht, die Aminosäuren der Peptidhydrolysate in die DNP-Verbindungen zu überführen, so war bei der darauffolgenden Chromatographie die Trennung unbefriedigend. Es gelang bei der Hälfte der Flecken nicht, sie abzugrenzen und getrennt auszuschneiden. Da sich die Ergebnisse trotz aller Bemühungen nicht verbesserten, wenn wir von einem Hydrolysat ausgingen, aber gut waren, wenn wir ein Aminosäurengemisch benutzten, schlossen wir, daß die Kohlenhydratbestandteile des Peptides an dem negativen Ergebnis Schuld hätten.

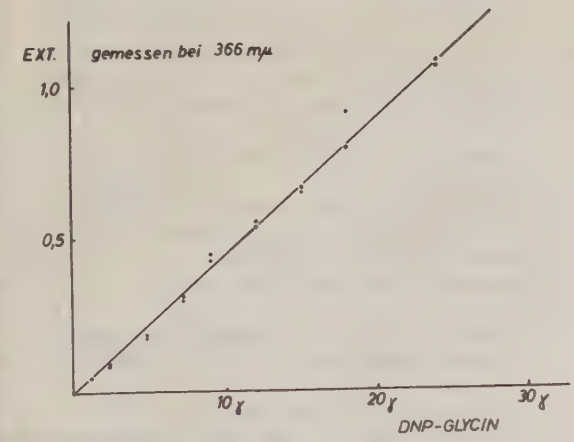


Abb. 16: Eichkurve für DNP-Glycin. Erklärung s. Text.

8. Quantitative Aminosäurenanalyse

Nach den erfolglosen Versuchen die Aminosäurenzusammensetzung der Glykomakropeptide mit der oben beschriebenen Methode nach LEVY quantitativ zu bestimmen, blieb die quantitative Bestimmung nach SPACKMAN, STEIN und MOORE (46). Da uns die automatisch registrierende Apparatur nicht zur Verfügung stand, wurde die Analyse von Herrn Prof. Mattenheimer, der diese Arbeit leitete, in Chicago durchgeführt.

Neben den von uns hergestellten Glykomakropeptiden nach Einwirkung von Pepsin und Lab auf Casein, wurde ein von Prof. Nischmann, Bern, nach Labeinwirkung hergestelltes Peptid mit untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1, Seite 15, wiedergegeben.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ABDERHALDEN, E. und BLUMBERG, P.: Derivate von Aminosäuren. Z. physiol. Chem. 65, 318 (1910)

2. ALAIS, Ch., MOCQUOT, G., NITSCHMANN, HS. und ZAHLER, P.: Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. - VII. Über die Abspaltung von Nicht-Protein-Stickstoff (NPN) aus Casein durch Lab und ihre Beziehung zur Primärreaktion der Labgerinnung der Milch. Helv. Chim. Acta 36, 1955 (1953)

3. ALAIS, Ch.: Etude des substances azotées nonproteiques (NPN) séparée de la caséine du lait de vache sous l'action de la présure. - XIV. Internat. Milchwirtschaftskongress Rom, Bd. 2, 823 (1956)

4. ALAIS, Ch. und JOLLÉS, P.: Human casein and its caseino-glykopeptide. Nature, Lond. 196 (4859) 1098 (1962)

5. ALAIS, Ch.: L'action de la présure sur la caséine: I. Le problème de la réaction specificque et du substrat. Le Lait, 428, 481 (1963)

6. BEEBY, R.: Studies on the kappa-casein complex. I. The release of sialic acid-containing material by rennin. J. Dairy Res. 30, 77 (1963)

7. BEEBY, R. und NITSCHMANN, HS: The action of rennin on casein. The disruption of the k-casein complex. J. Dairy Res. 30, 7 (1963)

8. BERRIDGE, N. J.: The purification and crystallization of rennin. Biochem. J. 39, 179 (1945)

9. BÖHM, St., DAUBERT, St. und BAUMEISTER, L.: Über Neuraminsäure, ihr Vorkommen und ihre Bestimmung im Serum. Klin. Wschr. 32, 289 (1954)

10. BOHREN, H. U.: Dissertation Bern (1954)

11. BOHREN, H. U. und WENNER, V. R.: Natural state of milk proteins. - I. Composition of the micellar and soluble casein of milk after ultracentrifugal sedimentation. J. Dairy Sci. 44, 1213 (1961)

12. BRUNNER, R.J. und THOMPSON, M.P.: Some characteristics of the glycomacropeptide of casein - a product of the primary rennin action. - J.Dairy Sci. 42, 1881 (1959)

13. CERBULIS, J., CUSTER, J.H. und ZITTLE, C.A.: Action of rennin and pepsin on α-casein: Paracasein and soluble products. Arch.Biochem.Biophys. 84, 417 (1959)

14. d.o. Action of rennin and pepsin on β-casein: Insoluble and soluble products. J.Dairy Sci. 43, 1725 (1960)

15. COMB, D.G. und ROSEMAN, S.: Composition and enzymatic synthesis of N-Acetylneuraminic Acid (Sialic acid). J.Am.Chem.Soc. 80, 497 (1958)

The hexosamine moiety of N-Acetylneuraminic acid (Sialic acid). J.Am.Chem.Soc. 80, 3166 (1958)

16. DREYWOOD, R.: Qualitative test for carbohydrate material. Ind.Eng.Chem.Anal.Ed. 18, 499 (1946)

17. FISH, J.C.: Activity and specifity of rennin. Nature 180, 345 (1957)

18. FISKE, C.H. und SUBBAROW, Y.: The colorometric determination of phosphorus. J.Biol.Chem. 66, 375 (1925)

19. GARNIER, J.: Etude cinétique de la protéolyse par la présure de la caséine kapp. Dissertation Landwirtsch.Fakult. Academie Paris Serie A, Nr. 3832, Ordnungsnummer 4783 (1962)

20. GARNIER, J. und CHEVALIER, R.: Action de la présure sur la caséine. Etude de la caséine précipitable par le calcium. C.r.Séances Acad.Sci. 252, 350 (1961)

21. GARNIER, J. und BRIGNON, G.: Etude de l'action de la présure sur la caséine par la methode titrimétrique à pH constant. Comparaison avec d'autres méthodes. Ann.Biol.Anim.Biophys. 3.(1) 71 (1963)

22. HABERMANN, W., MATTENHEIMER, H., SKY-PECK, H. und SINOHARA, H.: Über die Abspaltung eines Glykomakropeptides bei der Einwirkung von Pepsin auf Casein bei pH 6,8. Chimia 15, 339 (1961)

23. HAMMARSTEN, O.: Über die Milchgerinnung und die dabei wirkenden Fermente der Magenschleimhaut. Jahresber. Fortschr. Thierchem. 2, 118 (1872)

Über den chemischen Verlauf bei der Gerinnung des Caseins mit Lab. s.o. 4, 135 (1874)

Zur Kenntnis des Caseins und der Wirkung des Labfermentes. s.o. 7, 158 (1877)

24. JOLLÈS, P. und ALAIS, Ch.: Etudes de glycopeptide obtenu par action de la présure ("rennin") sur la caséine du lait de vache. C.r. Séances Acad. Sci. 251, 2605 (1960)

25. JOLLÈS, P., ALAIS, Ch. und JOLLÈS, J.: Etude comparée des caséino glycopeptides formés par action de la présure sur les caséines de vache, de brebis et de chèvre. I. Etude de la partie peptidique. Biochem. Biophys. Acta 51, 309 (1961)

26. JOLLÈS, P., ALAIS, Ch. und JOLLÈS, J.: Etude de la caséine de vache. Caractérisation de la liaison sensible à l'action de la présure. Biochim. Biophys. Acta 69, 511 (1963)

27. KIRCHMEIER, O.: Zur Frage der Labgerinnung. Milchwiss. 15, 331, (1960)

Über die Abspaltung von Milchsäure und Zitronensäure aus dem Casein beim Labgerinnungsvorgang. Milchwiss. 15, 559 (1960)

28. KOEHLER, L.R.: Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and color intensity. Anal. Chem. 24, 1576 (1952)

29. LAHAV, E. und BABAD, Y.: Action of rennin on α-, β- and γ-caseins. J. Dairy Res. 31, 31 (1964)

30. LAHAV, E. und BABAD, Y.: The reaction of rennin on α-, β- and γ-casein. Vortrag gehalten am 30.9.1964 von Prof. Babad in der Bundesforschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel. Referiert in Milchwiss. 19, 618 (1964)

31. LEVY, A.L. und CHUNG, D.: Two-dimensional chromatography of amino-acids on buffered papers. Anal. Chem. 25, 396 (1953)

32. LEVY, A.L.: A paper chromatographic method for the quantitative estimation of amino-acids. Nature 174, 126 (1954)

33. LINDERSTRØM-LANG, und KODAMA: C.R. Lab. Carlsberg 16, (1) (1925) zitiert nach LINDQVIST, B.: Casein and the action of rennin. Dairy Sci. Abstr. 25, 257 (1963)

34. LINDQVIST, B.: Casein and the action of rennin. Dairy Sci. Abstr. 25, 257 und 299 (1963)

35. LOHMANN, K. und JENDRASSIK, L.: Kolorimetrische Phosphorsäurebestimmung im Muskelextrakt. Biochem. Z. 178, 419 (1926)

36. MATTENHEIMER, H. und NITSCHMANN, HS.: Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. VIII. Die Abspaltung von Nicht-Protein-Stickstoff (NPN) aus Casein durch verschiedene proteolytische Fermente, verglichen mit der Abspaltung durch Lab. Helv. Chim. Acta 38, 687 (1955)

37. MELLANDER, O.: Elektrophoretische Untersuchung von Casein. Biochem. Z. 300, 240 (1939)

38. MORGAN, W.T.J. und AMINOFF, D.: Hexosamine components of the human blood group substances. Nature 162, 579 (1948)

39. NITSCHMANN, HS.: Elektronenmikroskopische Größenbestimmung der Calciumcaseinatteilchen in Kuhmilch. Helv. Chim. Acta 32, 1258 (1949)

40. NITSCHMANN, HS.: Chemie der Labgerinnung der Milch Chimia 17, 25 (1963)

41. NITSCHMANN, HS. und HENZI, R.: Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. - XIII. Untersuchung der bei der Labung in Freiheit gesetzten Peptide. Helv. Chim. Acta 42, 1985 (1959)

42. NITSCHMANN, HS. und BEEBY, R.: Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. - XIV. Aminosäurenzusammensetzung des aus κ-Casein durch Lab in Freiheit gesetzten Glykomakropeptides. Chimia 14, 318 (1960)

43. PARTRIDGE, S.M.: Aniline phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. Nature 164, 443 (1949)

44. PEDERSEN, K.O.: Ultracentrifugal and electrophoretic studies on the milk proteins. I. Introduction and preliminary results with fractions from skim milk. Biochem.J. 30, 948 (1936)

45. SANGER, F.: The free groups of insulin. Biochem.J. 39, 507 (1945)

46. SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. und MOORE, St.: Automatic recording apparatus of use in the chromatography of amino-acids. Anal.Chem. 30, 1190 (1958)

47. THOMPSON, M.P. und PEPPER, L.: Effect of neuraminidase on κ-casein. J.Dairy Sci. 45, 794 (1962)

48. WAKE, R.G.: Aust.J.Sci. 20, 147 (1957) zitiert nach LINDQVIST, B.: Casein and the action of rennin. Dairy Sci.Abstr. 25, 257 (1963)

49. WAKE, R.G.: Studies of casein. V. The action of rennin on casein. Aust.J.Biol.Sci. 12, 479 (1959)

50. WAUGH, D.F. und HIPPEL, P.H. v.: κ-casein and the stabilization of casein micelles. J.Amer.Chem.Soc. 78, 4576 (1956)

51. WINZLER, J.: Determination of serum glycoproteins. VI. Methods for determination of serum glycoproteins. Methods Biochem.Anal. Vol. 2, 292 (1955)

52. ZAHN, H.: Textilpraxis 1951, S. 127.

An dieser Stelle möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die ständige Betreuung auch von Amerika aus bei Herrn Prof. Dr. med. H. Mattenheimer, Chicago, bedanken.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. E. Schütte für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und für die vielen guten Ratschläge bei der Durchführung meiner Arbeit.

LEBENSLAUF

Am 24. März 1935 wurde ich in Döllenradung Kreis Landsberg/W. geboren.
Nach dem Besuch der Volksschule in Dechsel Kreis Landsberg/W. von 1941 bis Ende des Jahres 1944 hatte ich durch Flucht und Kriegsereignisse bedingt erst wieder ab Oktober 1945 die Gelegenheit, die 4. Volksschulklasse in Berlin-Steglitz zu beenden. Vom Herbst 1946 besuchte ich das Gymnasium zu Berlin-Steglitz, an dem ich im März 1955 die Reifeprüfung bestand.
Vom Sommersemester 1955 an studierte ich an der Freien Universität Berlin Medizin. Meine ärztliche Vorprüfung bestand ich nach dem Sommersemester 1957, die ärztliche Prüfung am 6. April 1961.

Während der klinischen Semester arbeitete ich als studentische Hilfskraft für mehrere Semester und nach dem Staatsexamen als Medizinalassistent für 6 Monate am Physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität Berlin (Prof. Dr. Dr. E. Schütte).

Seit meiner Approbation als Arzt, die ich am 30. April 1963 erhielt, arbeite ich als Assistenzarzt auf der Inneren Abteilung des St.-Hildegard-Krankenhauses.
Meine Tätigkeit wurde durch eine langdauernde Berufskrankheit unterbrochen.

Photodruck der Photo Copie